



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
REGIONAL E MEIO AMBIENTE**

**PROSTAGLANDINA E₂ NA OVULAÇÃO DE CAMUNDONGAS PRÉ-
PÚBERES**

JÉSSICA DE SOUZA ANDRADE

Porto Velho (RO)
2017



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
REGIONAL E MEIO AMBIENTE**

**PROSTAGLANDINA E₂ NA OVULAÇÃO DE CAMUNDONGAS PRÉ-
PÚBERES**

JÉSSICA DE SOUZA ANDRADE

Orientador: Dr. Luiz Francisco M. Pfeifer

Dissertação de mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de Concentração em Ambiente, Saúde & Sustentabilidade, para obtenção do Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Porto Velho (RO)
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Fundação Universidade Federal de Rondônia
Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

A553p Andrade, Jéssica de Souza.

Prostaglandina E2 na ovulação de camundongas pré-puberes / Jéssica de Souza Andrade. -- Porto Velho, RO, 2017.

48 f. : il.

Orientador(a): Prof. PhD Luiz Francisco Machado Pfeifer

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Fundação Universidade Federal de Rondônia

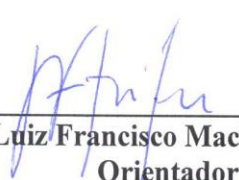
1.Murinos. 2.Ovulação. 3.Prostaglandina. I. Pfeifer, Luiz Francisco Machado. II. Título.

CDU 591.16

JÉSSICA DE SOUZA ANDRADE


PROSTAGLANDINA E₂ NA OVULAÇÃO DE CAMUNDONGAS PRÉ-PÚBERES

Comissão Examinadora




Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer
Orientador

Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia



Dra. Juliana Pavan Zuliani
Membro Titular

Fundação Universidade Federal de Rondônia

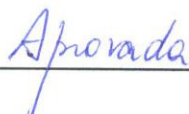


Dra. Evelyn Rabelo Andrade
Membro Titular

Fundação Universidade Federal de Rondônia

Porto Velho, 30 de agosto de 2017.

Resultado: _____



DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãs e familiares pelo exemplo, amor, carinho, amizade e incentivo; dedico-lhes essa conquista como imensa gratidão.

Todo dia de ontem pode ter sido árduo.
Muitas lutas vieram, deixando-te o cansaço.
Provas inesperadas alteram-te os planos.
Soma, porém, as bênçãos que Deus te entregou. Esquece qualquer sombra, não pares, serve e segue. Agora é novo dia, tempo de caminhar.

Emmanuel

AGRADECIMENTO

À Deus, por toda a sua bondade e misericórdia; estando sempre presente em minha vida.

Ao meu pai Claudemir de Andrade, por todo o amor, atenção e confiança; e a minha mãe Marilze de Souza Andrade, pelo seu amor e companheirismo ao meu pai com toda generosidade e também muito amor e carinho, dedicando intensamente sua vida a nós.

Às minhas maravilhosas irmãs Jacqueline e Rebeca que são minhas amigas de alma e coração; que me aconselham, me punem quando necessário, e me dão toda atenção e preocupação que é necessária para minha caminhada.

Ao meu orientador Luiz Francisco Machado Pfeifer, pela orientação e ensinamentos durante todas as etapas do mestrado, pela confiança em mim depositada, por todos os valiosos conselhos, que certamente contribuíram para a minha formação profissional e pessoal; e também por todo carinho com que me recebeu, pela atenção e preocupação. Muito obrigada!

Aos meus avós Carmem, Dulcinéia, Augustinho e Pedro por toda dedicação para comigo.

Aos meus tios que são como meus pais, me aconselhando e me dando forças para nunca desistir; e primos por estarem sempre comigo.

À minha afilhada Micaella Fernanda que me mostra a cada dia sua força e determinação, revelando o tão grandioso poder de Deus em nossas vidas. Te amo imensamente!

À Embrapa Rondônia e a Fiocruz Rondônia por ceder às instalações para que os experimentos fossem realizados.

Aos amigos que fiz na Embrapa Rondônia: Vanessa Lemos, Paulo Marcos, Jamyle Cestaro, Izabela Lemos, George Moreira, Vanessa Rachele, Alice Benites, Ricardo, Ribamar, seu Adaute e tantos outros. Obrigada pelo auxílio, amizade e receptividade durante minha estadia em Porto Velho e durante execução dos experimentos e atividades realizadas.

À Dra. Sulamita Setubal, Dra. Juliana Zuliani, André Aguirré, Jéssica Amaral, Charles Boeno, Mauro Paloschi e André Rosa da Fiocruz Rondônia pelos ensinamentos com a metodologia e manuseio dos camundongos para realização do experimento, e entre tantas outras metodologias testadas.

À turma 2015/2 do mestrado do PGDRA: Sabrina Matiello, Caio Pagani, Carolina Augusto, Pricianny Souza, Adriana Hang, Walkimar Aleixo, Matheus Lucas, Héliida Nobre, Camila Lemke, vocês são demais.

À professora Dra. Augrey Bagon, pela amizade e ajuda quando sempre precisei.

À professora Evelyn Andrade, por toda colaboração na banca examinadora.

A todos, e aqueles que não mencionei, mas de alguma forma me ajudaram durante esse período, a minha sincera gratidão!

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pelo apoio financeiro que permitiu a realização do mestrado.

RESUMO

O estudo das interações hormonais que definem o sucesso no processo de ovulação e concepção em mamíferos são pontos-chave para entender os eventos que controlam a reprodução e também no desenvolvimento de novos métodos e técnicas que visam aumentar a produtividade de animais de interesse zootécnico. Em mamíferos, a prostaglandina E_2 (PGE_2) atua em diversos tecidos e diferentes processos biológicos, servindo também como mediadora de eventos envolvidos na ovulação e na maturação de oócitos. Entretanto, ainda não existem estudos utilizando a PGE_2 como indutor de ovulação em mamíferos pré-púberes. O objetivo dessa dissertação foi estudar os efeitos da PGE_2 no tecido ovariano e, experimentalmente, avaliar o efeito da PGE_2 na ovulação de camundongas pré-púberes. Dessa forma, a primeira parte da dissertação contempla uma revisão bibliográfica acerca da participação das prostaglandinas nos diferentes eventos ovarianos e a segunda parte está descrita, em forma de artigo, sobre as atividades experimentais realizadas durante o mestrado. Estes estudos foram realizados para testar a hipótese de que a PGE_2 injetável induz a ovulação em camundongas pré-púberes. Para tanto, 3 estudos foram realizados. No primeiro estudo, foram utilizadas camundongas BALB/c pré-púberes, tratadas com 5 UI de eCG, intraperitoneal (i.p.), no Dia 0. No Dia 2, as camundongas foram divididas aleatoriamente em 3 grupos, para receberem via i.p.: 0.5 mL de PBS (n=31), 5 µg de GnRH (n=32) e 25 µg de PGE_2 (n=33). No Dia 3, as camundongas foram mortas e os ovidutos foram coletados para contagem de oócitos por meio da lupa estereomicroscópica. A proporção de camundongas que ovularam e o número de oócitos ovulados foi maior no grupo GnRH em comparação com fêmeas que receberam PBS e PGE_2 ($P=0.001$). No estudo 2, foi realizado um experimento piloto de dose-resposta para definir a concentração de PGE_2 capaz de induzir ovulação. Foram utilizadas camundongas BALB/c pré-púberes tratadas de forma similar ao estudo 1, entretanto, no Dia 2 foram separadas aleatoriamente entre seis grupos para receberem: 0.5 mL de PBS (n=3), 5 µg de GnRH (n=3), 25 µg de PGE_2 (n=3), 50 µg de PGE_2 (n=3), 150 µg de PGE_2 (n=3), 250 µg de PGE_2 (n=3). Não houve diferença no número de camundongos fêmeas que ovularam e o número de oócitos ovulados nas fêmeas tratadas com GnRH e 250 µg de PGE_2 , e ambos os grupos apresentaram diferenças em relação ao grupo PBS ($P<0.001$). O estudo 3 foi realizado para comparar a melhor dose-resposta de PGE_2 , obtida no estudo 2, com o GnRH. Neste estudo foram utilizadas camundongas BALB/c pré-púberes, que foram tratadas de forma similar ao estudo 1, entretanto, no Dia 2 foram separadas aleatoriamente para receberem: 0.5 mL de PBS (n=18), 5 µg de GnRH (n=16) e 250 µg de PGE_2 (n=16). A proporção de camundongas que ovularam e o número de oócitos ovulados foi maior nas fêmeas tratadas com GnRH e PGE_2 quando comparado com aquelas que receberam o tratamento com PBS ($P=0.001$). Os resultados destes estudos demonstram que a PGE_2 na dose de 250 µg induz a ovulação em camundongas pré-púberes.

Palavras-chave: Murinos, Ovulação, Prostaglandina.

ABSTRACT

The study of hormonal interactions that determine the success of ovulation and conception processes in mammals are key points to better understand the events that control reproduction and to develop methods that increase animal livestock production. In mammals, prostaglandin E_2 acts in several tissues and in different biological processes, as mediator of some periovulatory events and oocyte maturation. However, there are no studies using prostaglandin E_2 as ovulatory inducer in prepubertal mammals. Therefore, the objective of this master of science's thesis was to study the effect of PGE_2 in the ovarian tissue and, experimentally, evaluate the effect of PGE_2 in the ovulation process. Therefore, the first part of this master of science's thesis relies on the role of prostaglandins in the different ovarian events. The second part describes the experimental activities performed during the master of science period. The hypothesis tested was that the PGE_2 induces ovulation in prepubertal mice. For that purpose, three studies were performed. In Study 1, pre-pubertal BALB/c mice were treated with intraperitoneal (i.p.) eCG, on day 0. On day 2, the mice were randomly separated into 3 groups: PBS (n=31); GnRH (n=32); and 25 μ g of PGE_2 (n=33). On day 3, the mice were killed and the oviducts were collected for the oocyte count. The proportion of ovulated mice was greater in the GnRH group than in females of PBS and PGE_2 groups ($P < 0.001$). In the Study 2, a pilot study was performed to evaluate the effect of different doses of prostaglandin E_2 (PGE_2) on the ovulation of prepubertal female mice. Eighteen BALB/c prepubertal mice were treated with 5 IU of intraperitoneal (i.p.) eCG on day 0. On day 2, the mice were randomly distributed into 6 groups for the i.p. administration of: 1) 0.5 mL of PBS (n=3), 2) 5 μ g of GnRH (n=3), 3) 25 μ g of PGE_2 (n=3), 4) 50 μ g of PGE_2 (n=3), 5) 150 μ g of PGE_2 (n=3) e 6) 250 μ g of PGE_2 (n=3). There were no difference in the number of ovulated mice and number of ovulated oocyte in the females treated with GnRH and 250 μ g of PGE_2 , and both groups showed differences in comparison with PBS group ($P < 0.001$). In the Study 3, the prepubertal BALB/c mice were randomly distributed into PBS (n=18), GnRH (n=16) and 250 μ g of PGE_2 (n=16) groups. Females were treated similarly as in Experiment 1, except the animals from the PGE_2 group that received 250 μ g of i.p. PGE_2 . There were no difference in the number of ovulated mice and number of ovulated oocyte in the females treated with GnRH and PGE_2 , and both groups were greater than PBS group ($P < 0.001$). The results demonstrated that dose of 250 μ g of PGE_2 induces the ovulation in pre pubertal female mice.

Keywords: Mice, ovulation, prostaglandin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tratamentos hormonais utilizados para indução da ovulação em camundongas pré-púberes no Estudo 1 (A), Estudo 2 (B) e no Estudo 3 (C)	30
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporção de camundongas fêmeas pré-púberes que ovularam e a média de oócitos por camundonga tratadas com PBS, GnRH e 25 µg de PGE₂..... 32

Tabela 2. Proporção de camundongas pré-púberes que ovularam e média de oócitos por camundonga tratada com PBS, GnRH e diferentes doses de PGE₂ 32

Tabela 3. Proporção de camundongas pré-púberes que ovularam e média de oócitos por camundonga tratadas com PBS, GnRH e 250 µg de PGE₂..... 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Ácido araquidônico

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes

AdFLA₂ - Fosfolipase A₂ adiposa

Asp - Ácido aspártico

BE - Benzoato de estradiol

CCOs - Complexo cumulus-oócitos

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

cFLA₂ - Fosfolipase A₂ citosólicas

COX -Ciclooxigenases

COX-1 - Ciclooxigenase-1

COX-2 - Ciclooxigenase-2

eCG - Gonadrofina coriônica equina

ECP - Cipionato de estradiol

EET - Ácidosepoxieicosatrienoicos

EGF - Fator de crescimento epidérmico

EP - Receptor de prostaglandina

EP1- Receptor 1 de prostaglandina E₂ 1

EP2 - Receptor 2 de prostaglandina E₂ 2

EP3 - Receptor 3 de prostaglandina E₂ 3

EP4 - Receptor 4 de prostaglandina E₂ 4

ErbB - Receptor do fator de crescimento epidermal

ErbB1 - Receptor do fator de crescimento epidermal 1

ErbB4 - Receptor do fator de crescimento epidermal 4

GnRH - Hormônio liberador de gonadofina

Fiocruz Rondônia - Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia

FLA₂ - Fosfolipase A₂

FP - Receptor de prostaglandina F₂ alfa

FP_A - Variante A para receptor de prostaglandina F₂ alfa

FP_B - Variante B para receptor de prostaglandina F₂ alfa

g - Grama

hCG - Gonadotrofina coriônica equina

HETE – Ácidos hidroxieicosatetraenoicos

His - Histidina

HPETE - Ácidos hidroperoxieicosotetraenoicos

IA - Inseminação Artificial

IATF - Inseminação Artificial em Tempo Fixo

iFLA_{2s} - Fosfolipase A₂ independente de Ca²⁺

IL-1 - Interleucina1

IL-1 β - Interleucina1 beta

i.p. - Intraperitoneal

LFLA₂ - Fosfolipase A₂ lisossomais

LH - Hormônio luteinizante

LTs - Leucotrienos

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIV - Maturação *in vitro*

mL - Mililitros

O₂ - Oxigênio

°C - graus Celsius

PAF-AH - Acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas

PBS - Tampão fosfato-salino

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaqueta

PG - Prostaglandina

PGE₁ - Prostaglandina E₁

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PGF₂ α - Prostaglandina F₂ alfa

PGI₂ - Prostaglandina I₂ ou prostaciclina

PGG₂ - Prostaglandina G₂

PGs - Prostaglandinas

PIVE - Produção *in vitro* de embriões

p.v. - Peso vivo

RNAm - RNA mensageiro

RO - Rondônia

SCVPH - Scientific Committee Veterinary Measures relating to Public Health

Ser - Serina

sFLA₂-Fosfolipase A₂ secretadora

TXA₂ - Tromboxano A₂

µg - Micrograma

UI - Unidade Internacional

VBP - Valor Bruto de Produção

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1. OBJETIVOS.....	18
1.1. GERAL	18
1.2. ESPECÍFICOS	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1. BUSCA DE NOVAS MOLÉCULAS INDUTORAS DE OVULAÇÃO EM BOVINOS	19
2.2. PROSTAGLANDINAS	20
2.2.1. Prostaglandinas na reprodução.....	23
3. ARTIGO	26
Resumo	26
Abstract.....	26
Introdução	27
<i>Estudo 1</i>	28
<i>Estudo 2 - Estudo Piloto</i>	29
<i>Estudo 3</i>	29
<i>Análise estatística</i>	30
Resultados	31
Discussão	33
Referências.....	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
REFERÊNCIAS GERAIS.....	39

INTRODUÇÃO

A pecuária bovina brasileira possui dois segmentos que impactam significativamente a economia: a cadeia produtiva da carne e do leite. A bovinocultura tem grande importância social e econômica para uma determinada região, pois além de fornecer alimentos aos seus habitantes, também é responsável por gerar empregos e renda. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) relatou que em 2015 o Valor Bruto de Produção (VBP) da pecuária bovina no Brasil foi de R\$ 73,8 bilhões, atrás apenas do complexo soja, na qual seu VBP chegou a R\$ 106,4 bilhões no mesmo período. Este valor mostra a importância social e econômica destes dois segmentos da bovinocultura no país.

Atualmente, apesar de o Brasil possuir o segundo maior rebanho bovino do mundo com cerca de 215,2 milhões cabeças, ele dispõe do maior rebanho comercial mundial (MAPA, 2016; ANUALPEC, 2016). A pecuária de corte se destaca como o segundo maior produtor de carne do mundo e maior exportador mundial, produzindo 8.358.976 toneladas de carne bovina em 2015, dos quais cerca de 1,6 milhões de toneladas de carne industrializada e *in natura* foram destinadas ao mercado externo (MAPA 2014; ANUALPEC, 2016). Conforme dados da ABIEC (2016), no ano de 2016, o Brasil exportou carne bovina para 133 países. Quanto à produção de leite, o Brasil foi responsável por produzir cerca de 24 bilhões de litros em 2015, ocupando a sexta posição no *ranking* mundial, com tendência de crescimento nos próximos anos (MAPA, 2014; ANUALPEC, 2016). Apesar do grande volume de produção, o rebanho brasileiro é caracterizado por baixa produtividade. O Brasil, ainda, possui o segundo maior rebanho leiteiro do mundo, com cerca de 40 milhões de cabeças, apresentando aproximadamente 17 milhões de vacas leiteiras secas ou em lactação. Isso significa que a produtividade do rebanho nacional é de 5,3 litros/vaca/dia, considerando um período de lactação de 270 dias (ANUALPEC, 2016).

Rondônia, com mais de 13 milhões de cabeças de bovinos (IDARON, 2015), se destaca como o sétimo estado com o maior rebanho. Na região Norte é o maior produtor de leite e o segundo maior produtor de carne bovina, ficando atrás somente do Pará. O rebanho rondoniense produziu cerca de 1 bilhão de litros de leite e, aproximadamente, 379 mil toneladas de carne em 2015, sendo responsável por 53,01% e 25,64% da produção de leite e carne, respectivamente, na região Norte nesse mesmo período (ANUALPEC, 2016). Além de ser o estado com a oitava maior produção de carne bovina do país, é o quinto maior exportador de carne do Brasil (EMATER, 2016).

Apesar disso, a eficiência produtiva do rebanho vem trazendo grande preocupação, principalmente agora, em que a busca por práticas sustentáveis têm impulsionado pesquisadores a desenvolverem tecnologias que permitam produzir cada vez mais em menores extensões de terra e com menos insumos. Neste sentido, para se obter uma maior eficiência reprodutiva é necessário investir em sistemas de produção mais tecnificados, especialmente àqueles que empregam biotécnicas da reprodução como a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a inseminação artificial (IA) associado ao controle farmacológico do ciclo estral (NEVES et al., 2010).

Neste âmbito, em sistemas de produção animal, a busca de moléculas mais eficientes que atuam em processos biológicos imprescindíveis para o sucesso reprodutivo estão sendo objeto de estudo de vários grupos de pesquisa. O estudo aprofundado dos processos biológicos que estão envolvidos nos eventos de ovulação e concepção pode representar o primeiro passo para o desenvolvimento e validação de produtos que podem incidir positivamente nos índices de produção. Dentre as alternativas que podem ser estudadas, as prostaglandinas (PGs) representam moléculas de grande interesse, pois possuem diversas funções biológicas nos tecidos reprodutivos (WEEMS et al., 2006).

Todos os prostanoides (compreendendo as prostaglandinas, prostaciclinas, e tromboxanos) atuam de forma autócrina e parácrina em diferentes órgãos e tecidos (SMITH, 1992; WEEMS et al., 2006). São mediadores lipídicos, de meia vida curta, que modulam ou medeiam vários processos fisiológicos e patológicos por meio de receptores de superfície presentes na célula alvo. Suas funções se destacam por atuarem nos processos de homeostase, agindo também no balanço hídrico e filtração glomerular, proteção gástrica, ovulação, implantação e desenvolvimento embrionário, no parto, como também nos processos inflamatórios e resposta imunológica (BREYER et al., 1996; HARRIS et al., 2002; WEEMS et al., 2006; MOREIRA, 2007). Além disso, as enzimas COX-1 e COX-2 servem como enzimas marca-passo na produção das PGs (DUFFY; STOUFFER, 2001). As prostaglandinas E_2 e $F_2\alpha$ (PGE_2 e $PGF_2\alpha$) atuam por meio dos receptores acoplados a proteína G designados EP (EP1-EP4) e FP (FP_A e FP_B), respectivamente (AROSH et al., 2004). À nível ovariano, Tsai et al., (1996) identificaram transcritos de RNAm para receptores FP e EP3 nas células da teca e granulosa em bovinos. Em camundongos, a deleção genética de receptores EP2 para PGE_2 , reduz o número de descendentes, sugerindo que a PGE_2 é uma PG de grande importância para a ovulação nestes animais (KENNEDY et al., 1999; SUGIMOTO et al., 1997). Similarmente, em ovinos a $PGF_2\alpha$ parece ser uma PG necessária para o processo ovulatório (MURDOCH et al., 1986). Além disso, já foi demonstrada a presença de receptores EP e FP

em células da teca e granulosa de folículos pré-ovulatórios coletados após tratamento com GnRH, sugerindo a atuação local dessas PGs na cascata ovulatória de bovinos (BRIDGES; FORTUNE, 2007).

Apesar das evidências de que a PGE_2 atua ativamente na ovulação, não se sabe se essa molécula, em soluções injetáveis, pode ser usada como indutor de ovulação em animais de interesse comercial. Inicialmente, para obter informações sobre o efeito da PGE_2 como indutor de ovulação, estudos devem ser realizados em cobaias (camundongos, por exemplo) devido a fatores econômicos. Cobaias são ótimos modelos experimentais e servem a esses propósitos, pois são de pequeno porte, de simples manipulação, dóceis, de fácil alimentação, ocupam pouco espaço, possuem alta capacidade reprodutiva e um pequeno período de gestação, permitindo que os estudos sejam realizados em um curto período de tempo. Dessa forma, camundongos são cobaias que podem ser utilizados de forma eficiente para avaliar, de forma inicial, se a PGE_2 pode induzir a ovulação em mamíferos.

Baseado nestas considerações, os estudos realizados nesta dissertação foram efetuados para avaliar a eficiência da PGE_2 injetável na indução da ovulação de camundongas pré-púberes. Para isso, foram realizados três estudos, durante o período de fevereiro a novembro de 2016, utilizando a PGE_2 como indutor de ovulação em fêmeas de camundongos pré-púberes. Os estudos estão disponibilizados em um artigo científico, que será submetido para publicação.

1. OBJETIVOS

1.1. GERAL

Estudar os efeitos da prostaglandina E_2 injetável na indução da ovulação de camundongas pré-púberes.

1.2. ESPECÍFICOS

1. Avaliar a ovulação de camundongas pré-púberes tratadas com PBS, GnRH e PGE_2 ;
2. Quantificar o número de oócitos ovulados em camundongas pré-púberes tratadas com PBS, GnRH e PGE_2 ;
3. Avaliar o efeito de diferentes doses de PGE_2 na indução de ovulação em camundongas pré-púberes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. BUSCA DE NOVAS MOLÉCULAS INDUTORAS DE OVULAÇÃO EM BOVINOS

O aumento da eficiência na pecuária dentro do sistema de produção vem solicitando novos conhecimentos técnicos e científicos, onde diversas instituições estão exercendo um papel de grande importância na busca de resultados referentes ao aumento da produção animal. As biotecnologias da reprodução animal vêm atuando diretamente neste processo, tanto para aumentar a eficiência do sistema de produção, por serem ferramentas de estudo e pesquisa, como também para ampliar o número de animais de alto valor genético (PAULA et al., 2008).

Neste âmbito, o controle exógeno do ciclo estral de animais utilizados na IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo) e na sincronização de receptoras de embriões em rebanhos de corte e leite no Brasil é amplamente utilizado. Apesar dos grandes benefícios zootécnicos desses programas, alguns dos fármacos que são utilizados nesses tratamentos ainda são motivos de amplas discussões, principalmente quando se refere à segurança alimentar dos seres humanos que ingerem alimentos derivados dos animais tratados com estes produtos (CASTRO, 2015). Muitos destes tratamentos utilizam os ésteres de estradiol (Benzoato, Valerato e Cipionato de estradiol) em associação a outros fármacos para induzir crescimento de onda folicular ovariana e também ovulação de folículos dominantes de forma sincronizada (BO et al., 1995). Muitos países optam pelo uso destes ésteres de estradiol por possuírem alta eficiência e baixo custo; e quando a administração ocorre em associação a progestágenos, resultam em um aceitável desenvolvimento folicular e taxa de fertilidade (BO et al., 1994; BO et al., 1995).

Por outro lado, existem diversas regulamentações internacionais que relatam o uso destes fármacos relacionado ao seu potencial efeito tóxico sobre a saúde pública. O conselho diretivo 96/22/EC de 29 de abril de 1996, da União Européia determinou a proibição da administração de substâncias que possuam efeito hormonal ou de substâncias β -agonistas na criação de animais, sendo permitido seu uso apenas em algumas aplicações terapêuticas e zootécnicas (COMINIDADE EUROPEIA, 1996). Entretanto, em 2008, a publicação da Diretiva nº 2008/97/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, em 19 de novembro, proíbe a administração do estradiol e seus ésteres em animais de todas as espécies, para assegurar o

bem-estar animal e a saúde humana, com base no comitê científico “Veterinary Measures relating to Public Health” (SCVPH) de 30 de abril de 1999 que apontou um grande número de evidências que sugeriam que o estradiol-17 β deveria ser considerado como um agente carcinogênico, por apresentar efeito como iniciador e promotor do crescimento de tumores, principalmente os relacionados ao câncer de mama em humanos decorrentes dos resíduos hormonais presentes nos alimentos derivados dos animais tratados com este composto. A proibição da utilização desses ésteres se fez permanente em alguns países visto que já existem produtos alternativos eficazes disponíveis (como os análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas – GnRH, hormônio luteinizante – LH e gonadotrofina coriônica humana - hCG) que são utilizados na criação de animais para produção de alimentos sem produzir impactos na criação e na segurança animal e humana (COMUNIDADE EUROPEIA, 2008).

Neste contexto, no intuito de garantir melhor segurança de alimentos e, conseqüentemente, à saúde dos consumidores, é necessário que busquemos moléculas cada vez mais sustentáveis e sem poder residual quando administradas em animais de interesse zootécnico que são submetidos aos protocolos de indução de ovulação. Isso contribui para o fornecimento de produtos seguros e de qualidade, reduzindo riscos ao meio ambiente e com menores custos, resultando em impactos positivos na cadeia produtiva em longo prazo.

2.2. PROSTAGLANDINAS

A farmacodinâmica das prostaglandinas foram primeiramente descobertas mediante a observação de uma tira de útero humano que reagia por meio de fortes contrações ou relaxamento quando em contato com o sêmen humano fresco (KURZROK; LIEB, 1930). Após vários experimentos, a “substância P” foi inicialmente isolada de extratos de fluídos seminais das glândulas sexuais masculinas de humanos e de certos animais que continham lipídios, se observou que esta ação estava associada a frações contendo ácidos lipossolúveis. Então, Euler (1935), nomeia a substância ativa de “prostaglandina”, acreditando, erroneamente, que sua síntese estava associada exclusivamente como parte das secreções da próstata (EULER, 1935, 1936, 1939).

Alguns anos depois, Bergstrom e Sjovall (1957) fizeram o isolamento das prostaglandinas (PGE₂ e PGF₂ α) na forma pura cristalina a partir da glândula vesicular de carneiros para observação dos efeitos biológicos destes dois compostos sobre a pressão arterial de coelhos e em várias preparações de músculo liso de diferentes

espécies (BERGSTROM et al., 1959). Tempos depois, foi elucidada a estrutura química das prostaglandinas (BERGSTROM et al., 1962).

Quimicamente, todas as prostaglandinas fazem parte do grupo dos eicosanoides derivadas do ácido graxo que apresentam 20 átomos de carbono e exibem em sua estrutura básica o ácido prostanoico, o ácido araquidônico (AA). Grande parte das prostaglandinas ($\text{PGF}_2\alpha$, PGI_2 , PGE_2) possuem ligações duplas nos carbonos 5-6 e 13-14, porém a PGE_1 tem apenas uma ligação nos carbonos 13-14 e é derivada do ácido di-homo- γ -linoleico. Um grupo OH no carbono 15 e as duplas ligações nos átomos de carbonos 13-14 são essenciais para a atividade biológica destas moléculas (BERGSTROM et al., 1968; RAMWELL et al., 1977; WEEMS et al., 2006).

O primeiro passo para a biossíntese das prostaglandinas ocorre pela liberação ou mobilização do AA da posição Sn-2 da membrana fosfolipídica por uma ou mais lipases da família da fosfolipase A_2 (FLA_2) por hidrólise (DENNIS, 1983; KATZUNG et al., 2014), sendo dependente da presença de sais de cálcio (Ca^{2+}) no espaço intracelular para sua ativação e controle (DENNIS, 1983; SMITH, 1992; DENNIS, 1994). As FLA_2 estão distribuídas em grupos que intercedem à liberação de AA da membrana lipídica, e compreendem: FLA_2 secretoras (sFLA_2), FLA_2 citosólicas (cFLA_2), a FLA_2 independente de Ca^{2+} (iFLA_{2s}), as acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH), FLA_2 lisossomais (LFLA_2) e FLA_2 adiposa (AdFLA_2) (MURAKAMI et al., 1997; DENNIS et al., 2011; KATZUNG et al., 2014; DENNIS, 2015). A atividade catalítica dessas enzimas é formada por uma díade ou tríade de aminoácidos, constituindo: Serina (Ser), Histidina (His) e/ou Ácido aspártico (Asp), sendo dependentes ou não de Ca^{2+} e uma molécula de H_2O para atividade catalítica (DENNIS et al., 2011).

Atualmente, com o progresso da biologia celular e molecular foram identificadas diversas outras isoenzimas para FLA_2 . Hoje, as FLA_2 são subdivididas em 16 grupos (I ao XVI) com base em sua localização na célula, sua sequência de aminoácidos, peso molecular, pontes dissulfeto intramoleculares e a dependência de Ca^{2+} para atividade enzimática (BALSINDE et al., 2002; DENNIS et al., 2011). O AA formado através a ação da fosfolipase A_2 é metabolizado por diversos complexos enzimáticos, que compreendem as ciclooxygenases, as lipoxigenases e o citocromo P450. Estas enzimas formam produtos denominados de eicosanoides, que inclui os prostanoïdes, os leucotrienos (LTs), os ácidos hidroperoxieicosotetraenoicos (HPETE) e hidroxieicosatetraenoicos (HETE), os ácidos epoxieicosatrienoicos (EET), entre vários outros produtos (MOREIRA, 2007; KATZUNG et al., 2014).

Após a ação da FLA₂ para a mobilização do AA, entra outro mecanismo enzimático, o das ciclooxigenases (COX) que reage com duas moléculas de oxigênio (O₂) e forma o endoperóxido prostaglandina G₂ (PGG₂) e uma reação de peroxidase, que reduz o grupo 15-hidropéroxí e forma a prostaglandina H₂ (PGH₂). Por serem intermediários muito instáveis, rapidamente sofrem a ação de sintases específicas, dando origem a uma diversidade de eicosanoides, como as prostaglandinas das séries E, D, e F, além das prostaciclins (PGI₂) e tromboxanos (TXA₂) (HARRIS et al., 2002; MOREIRA, 2007).

A via das ciclooxigenases foi a primeira a ser descoberta entre as rotas metabólicas do ácido araquidônico, e nela está envolvida a enzima (COX), também denominada como prostaglandina endoperóxido sintetase ou prostaglandina G/H sintetase (STRYER, 1992; VANE et al., 1998). Foi purificada pela primeira vez no ano de 1976 e clonada em 1988, sendo a enzima principal para a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas (VANE et al., 1998).

A COX apresenta duas principais isoformas distintas, sendo referidas como COX-1 e COX-2. A COX-1 é constitutivamente expressa em quase todos os tecidos, incluindo o ovário e tecidos reprodutivos, e é responsável pela formação dos prostanoides em condições fisiológicas, porém, não está regulada em resposta ao aumento de LH ou pela administração de hCG (HEDIN et al., 1987; WONG et al., 1991; KNOBIL; NEILL'S, 2006). No entanto, a COX-2 é induzível, estando presente nas lesões inflamatórias, controle do crescimento celular, ovulação, parto, entre outros (VANE et al., 1998; WEENS et al., 2006). No ovário, esta isoforma se expressa nas células da granulosa e células do cumulus de oócitos somente após o aumento das concentrações de LH/hCG, sendo indetectável em folículos que ainda não tiveram estímulo para ovular (SIROIS et al., 1992; RICHARDS, 1997; JOYCE et al., 2001; KNOBIL; NEILL'S, 2006).

Quanto à COX-2, transcritos RNAm e proteínas para esta enzima tem sido detectados em folículos pré-ovulatórios, estando presente nas células da granulosa de diferentes espécies, como em ratos (SIROIS et al., 1992), camundongos (TAKAHASHI et al., 2006), bovinos (LIU et al., 1997), equinos (SIROIS; DORE, 1997) e humanos (BEM-AMI et al., 2006). Richards (1997) relatou que altas concentrações de gonadotrofinas induziram a expressão de COX-2 nas células da granulosa, diferentemente da COX-1, que apresentou níveis baixos ou indetectáveis. No fluido folicular de bovinos, o aumento nas concentrações de PGE₂ e PGF_{2α} foram associados à dinâmica da expressão de COX-2 nas células da granulosa, logo após o pico de LH ou da administração de hCG (SIROIS, 1994; LIU et al., 1997). Barreta (2008) demonstrou através do sistema de co-cultivo *in vitro* de oócitos e folículos bovinos, que o

reinício da meiose em oócitos induzida pela angiotensina II é dependente da produção de ciclooxigenases pelas células foliculares e que as prostaglandinas E_2 e $F_{2\alpha}$ também atuaram no reinício da meiose, mostrando que a síntese de prostaglandinas via COX-2 é imprescindível na fase final da diferenciação folicular e maturação nuclear do oócito.

A regulação da COX-2 ocorre por uma vasta quantidade de mediadores que estão envolvidos na inflamação, considerando os lipopolissacarídeos, citocinas e fatores de crescimento como o epidérmico (EGF) e derivado de plaqueta (PDGF) (DIAZ et al., 1992; LYONS-GIORDANO et al., 1993; CHEPENIK et al., 1994; HINZ; BRUNE, 2001), fatores mitôgenicos (XIE, et al., 1991), e em resposta a gonadotrofinas (LIU et al., 1997). No caso das citocinas, elas possuem grande importância durante a ovulação, sendo secretadas por leucócitos migratórios e/ou pelas próprias células dos folículos ovulatórios; incluindo a IL-1, TNF- α e fatores estimulantes de colônias (CFS) (HUNTER, 2003). Khan et al (1998) relataram concentrações relativamente altas de IL-1 no fluído folicular de humanos, e Brannstrom et al. (1994) mostraram a bioatividade da IL-1 durante a ovulação em ovários de ratos, sendo sua expressão induzida pelo LH. A expressão de RNAm para IL-1 β também aumentou nos ovários de ratos e humanos, principalmente nas região das células da teca e granulosa, momentos antes da ovulação (HURWITZ et al., 1991; HURWITZ et al., 1992). Folículos pré-ovulatórios de ratas imaturas incubados com IL-1 e TNF- α por vinte e quatro horas, estimularam a produção de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, bem como a produção de progesterona (BRÄNSTRÖM et al., 1993)

2.2.1. Prostaglandinas na reprodução

As prostaglandinas são moléculas orgânicas muito potentes que atuam em uma enorme variedade de tecidos e processos biológicos (FERNANDES; FIGUEIREDO, 2007). Estão envolvidas em diversos mecanismos biológicos, como na luteólise, crescimento folicular, ovulação, eclosão e implantação embrionária, no reconhecimento e manutenção da gestação, no parto e fisiologia pós-parto (HAFEZ; HAFEZ, 2004; WEEMS et al., 2006). As prostaglandinas também são amplamente utilizadas no controle exógeno do ciclo estral em bovinos, principalmente a $PGF_{2\alpha}$.

A prostaglandina endógena possui uma série de atividades, mas a atuação mais agregada às prostaglandinas é a promoção de contrações ou relaxamento das células musculares lisas em diversos órgãos (FERNANDES; FIGUEIREDO, 2007), sendo que a propriedade terapêutica mais utilizada na reprodução é a competência de algumas

prostaglandinas da série F provocarem a luteólise (TSAI; WILTBANK, 1997), causando a regressão morfológica e funcional do corpo lúteo (VIANA et al., 1999; KOTWICA et al., 2002). O uso da $\text{PGF}_2\alpha$ permite maiores taxas de estro e de IA quando comparado com outros sistemas que fazem a utilização apenas da detecção de cio (BARUSELLI; MARQUES, 2002; PFEIFER et al., 2005); porém, quando não há administração associada aos progestágenos, o cio não se manifesta de forma sincronizada, manifestando-se durante um período de aproximadamente cinco dias. Assim, a maior parte dos protocolos utilizados para a sincronização de cio e IATF emprega os análogos de PGF em associação a outros fármacos, como a progesterona exógena, GnRH, eCG, LH e estrogênios (WEEMS et al., 2006; PFEIFER et al., 2009; CASTRO, 2015).

Atualmente, os prostanoides também estão sendo considerados mediadores da ovulação e da maturação de oócitos. No caso das prostaglandinas E_2 e $\text{F}_2\alpha$ começam a aumentar seus níveis durante o início do processo de ovulação e atingem um pico próximo ao momento da ovulação (SIROIS, 1992; LIU et al., 1997; DUFFY; STOUFFER, 2001). Aumentos das concentrações de PGE_2 e $\text{PGF}_2\alpha$ no fluido folicular de folículos ovulatórios e nos tecidos ovarianos são progressivos em 70 vezes e 20 vezes, respectivamente (HUNTER, 2003). Em bovinos, ainda é desconhecido o efeito direto das PGs no crescimento de folículos antes do aumento do LH para dar início à ovulação (WEEMS et al., 2006), mas se sabe que a $\text{PGF}_2\alpha$ aumenta a resposta da adeno-hipófise ao GnRH para liberar LH em vacas pós-parto (RANDEL et al., 1996). Em ovinos, as concentrações de PGE_2 e $\text{PGF}_2\alpha$ no líquido folicular não se modificam após o pico de LH, porém, na parede do folículo, a COX-2, a PGE_2 e $\text{PGF}_2\alpha$ aumentam suas concentrações nas 8 horas iniciais ao aumento do LH, permanecendo elevada durante 12 horas, e somente após 16-20 horas, apenas a PGE_2 diminui sua concentração (MURDOCH et al., 1981, 1986, 1991). Em bovinos, está presente uma maior expressão de receptores para $\text{PGF}_2\alpha$ nas células da teca e granulosa, sendo observada após o pico de LH. Porém, dentro dos quatro tipos de receptores para a PGE_2 (EP1-EP4), apenas os receptores EP2 e EP4 foram expressos após o pico de LH nestas células (BRIDGES; FORTUNE, 2007; BARRETA, 2008).

Um estudo mostrou que doses de indometacina (inibidor não seletivo da COX) bloqueiam a ovulação, como também impedem a apoptose de células da parede apical do folículo dominante e do epitélio adjacente da superfície ovariana que cobre o ápice do folículo, sendo um processo importante para a ruptura do folículo de ovinos (MURDOCH, 1996). Além disso, o tratamento com indometacina em coelhos e em ratos fêmeas

bloquearam a ovulação, sugerindo a um papel importante das PGs para a ruptura folicular (ARMSTRONG; GRINWICH, 1972; O'GRADY et al. 1972; HUNTER, 2003).

O papel e o mecanismo específico das PGs no processo ovulatório ainda não são claros. Ainda não se sabe se elas funcionam para mediar e/ou moderar a ovulação. Assim, ainda é incerto se o aumento dos prostanoídes convém para a promoção dos eventos degradativos que conduzem a ruptura do folículo ovulatório ou se surgem em resposta a resposta inflamatória devido às alterações no folículo, mas se sabe que existe uma contribuição das PGs na regulação da collagenase e estimulação do ativador de plasminogênio, como influência sobre a permeabilidade vascular e na quimiotaxia de leucócitos (ESPEY, 1994; HUNTER, 2003).

Estudos anteriores relataram a função da PGE₂ na estimulação da expansão das células do cumulus em camundongos (EPPIG, 1981) e em ratos (PHILLIPS; DEKEL, 1982). Em camundongos *knockout* para COX-2 houve defeitos na ovulação, bem como expansão anormal das células do cumulus e subsequente formação de estigmas. A ovulação também foi restaurada por meio do tratamento com PGE₂ simultaneamente com gonadotrofinas nestes animais, sugerindo a implicação da síntese de prostanoídes pela COX-2 para diferenciação folicular e maturação de oócitos (DAVIS et al., 1999; LIM et al., 1997; BARRETA, 2008).

Em bovinos, oócitos maturados *in vitro* apresentaram em suas células do cumulus a expressão de receptores para PGE₂. Com o decorrer na maturação *in vitro*, o receptor EP1 não é expresso, o EP2 sofre *upregulation* ao longo da maturação e o EP4 foi expresso em níveis baixíssimos (CALDER et al., 2001). O EP2 é detectado nas células do cumulus de ratos, e a deleção deste receptor gera defeitos na expansão do cumulus, ovulação e fertilização nestes animais (HIZAKI et al., 1999; TILLEY, et al. 1999; KENNEDY et al., 1999).

A administração sistêmica de indometacina em ovinos anulou a expansão das células do cumulus e a maturação de oócitos, sendo que este efeito foi revertido após a administração intrafolicular de PGE₂ (MURDOCH, 1988; MURDOCH, 1996). Adicionalmente, a administração intrafolicular de indometacina em bovinos diminuiu a concentração de PGE₂ no fluido folicular induzida pelo LH (LI et al., 2006). A PGE₂ estimula a expressão de RNAm de alguns EGF (fator de crescimento epidermal), como a anfiregulina e epiregulina nas células da granulosa de humanos (BEM-AMI, et al., 2006). A anfiregulina e a epiregulina estimulam a expansão da célula do cumulus e a maturação oocitária através da promoção do reinício da meiose em oócitos de roedores (PARK et al., 2004).

3. ARTIGO

Prostaglandina E2 na ovulação de camundongas pré-púberes

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da prostaglandina E₂ (PGE₂) na ovulação de camundongas pré-púberes. No estudo 1, foram utilizadas 96 camundongas BALB/c pré-púberes, tratadas com 5 UI de eCG via intraperitoneal (i.p.), no Dia 0. No Dia 2, as camundongas foram divididas aleatoriamente em 3 grupos, para receberem via i.p.; 1) 0.5 mL de PBS (n=31), 2) 5 µg de GnRH (n=32) e 3) 25 µg de PGE₂ (n=33). No Dia 3, as camundongas foram mortas por deslocamento da cervical e os ovidutos foram coletados para contagem de oócitos através da técnica de transiluminação sob estereomicroscópio. A proporção de camundongas que ovularam e o número de oócitos ovulados foi maior no grupo GnRH em comparação com fêmeas que receberam PBS e PGE₂ (P=0.001). No estudo 2, foram utilizadas 18 camundongas BALB/c pré-púberes, que foram tratadas de forma similar ao estudo 1, entretanto, no Dia 2 foram separadas aleatoriamente entre 6 grupos para receberem: 0.5 mL de PBS (n=3), 5 µg de GnRH (n=3), 25 µg de PGE₂ (n=3), 50 µg de PGE₂ (n=3), 150 µg de PGE₂ (n=3), 250 µg de PGE₂ (n=3). Não houve diferença no número de camundongos fêmeas que ovularam e o número de oócitos ovulados nas fêmeas tratadas com GnRH e 250 µg de PGE₂, e ambos os grupos apresentaram diferenças em relação ao grupo PBS (P<0.001). No estudo 3, foram utilizadas 50 camundongas BALB/c pré-púberes, que foram tratadas de forma similar ao estudo 1, entretanto, no Dia 2 foram separadas aleatoriamente para receberem: 0.5 mL de PBS (n=18), 5 µg de GnRH (n=16) e 250 µg de PGE₂ (n=16). A proporção de camundongas que ovularam e o número de oócitos ovulados foi maior nas fêmeas tratadas com GnRH e PGE₂ quando comparado com aquelas que receberam o tratamento com PBS (P=0.001). Os resultados destes estudos demonstram que a PGE₂ na dose de 250 µg induz a ovulação em camundongas pré-púberes.

Palavras-chave: ovulação, murinos, prostaglandinas.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of prostaglandin E₂ (PGE₂) on the ovulation of prepubertal female mice. For that purpose, three studies were performed. In Study 1, pre-pubertal BALB/c mice were treated with intraperitoneal (i.p.) eCG, on day 0. On day 2, the mice were randomly separated into 3 groups: PBS (n=31); GnRH (n=32); and 25 µg of PGE₂ (n=33). On day 3, the mice were killed and the oviducts were collected for the oocyte count. The proportion of ovulated mice was greater in the GnRH group than in females of PBS and PGE₂ groups (P<0.001). In the Study 2, a pilot study was performed to evaluate the effect of different doses of prostaglandin E₂ (PGE₂) on the ovulation of prepubertal female mice. Eighteen BALB/c prepubertal mice were treated with 5 IU of intraperitoneal (i.p.) eCG on day 0. On day 2, the mice were randomly distributed into 6 groups for the i.p. administration of: 1) 0.5 mL of PBS (n=3), 2) 5 µg of GnRH (n=3), 3) 25 µg of PGE₂ (n=3), 4) 50 µg of PGE₂ (n=3), 5) 150 µg of PGE₂ (n=3) e 6) 250 µg of PGE₂ (n=3). There were no difference in the number of ovulated mice and number of ovulated oocyte in the females treated with GnRH and 250 µg de PGE₂, and both groups showed differences in comparison with PBS group (P<0.001). In the Study 3, the prepubertal BALB/c mice were randomly distributed into PBS (n=18), GnRH (n=16) and 250 µg of PGE₂ (n=16) groups. Females were

treated similarly as in Experiment 1, except the animals from the PGE₂ group that received 250 µg of i.p. PGE₂. There were no difference in the number of ovulated mice and number of ovulated oocyte in the females treated with GnRH and PGE₂, and both groups were greater than PBS group ($P < 0.001$). The results demonstrated that dose of 250 µg of PGE₂ induces the ovulation in pre pubertal female mice.

Keywords: ovulation, mice, prostaglandins.

Introdução

A ovulação em mamíferos é resultante do aumento sérico da concentração de estradiol pelo folículo pré-ovulatório, o qual induz os neurônios do hipotálamo a liberarem GnRH, que, por sua vez, induz o pico do hormônio luteinizante (LH) pela adeno-hipófise ativando a cascata ovulatória. Esse aumento dos pulsos e da frequência de liberação do LH estimula uma série de eventos e mudanças estruturais no folículo pré-ovulatório (YOSHIMURA; WALLACH, 1987; HUNTER, 2003), sendo que uma das consequências deste evento é o aumento dos níveis de prostaglandinas (PGs) dentro do folículo (DUFFY; STOUFFER, 2001).

As prostaglandinas exercem diferentes funções fisiológicas e farmacológicas sobre o sistema reprodutivo feminino de diferentes espécies (WEEMS et al., 2006). Nos ovários, as prostaglandinas atuam como mediadores de algumas ações periovulatórias após o aumento da gonadotrofina ovulatória, estimulando contrações do músculo liso do ovário e também o aumento do fluxo sanguíneo e da pressão intrafolicular (ESPEY, 1978; WALLS et al., 1986). Além disso, a ação das prostaglandinas já foi associada a ruptura de lisossomos no interior das células da granulosa, os quais liberam seu conteúdo enzimático que deteriora o tecido conectivo na região do estigma ovulatório (BJERSING; CAJANDER, 1974). Aumentos das concentrações de PGs no fluido folicular, após o pico de LH, foram detectados em animais domésticos e roedores, aproximadamente 10 horas antes da ruptura do folículo, sugerindo que a prostaglandina possui papel importante no momento da ovulação (DUFFY; STOUFFER, 2001). Roedores *knockout* para a expressão de receptor de PGE₂ (EP2) apresentaram defeitos na expansão das células do cumulus do oócito e redução do número de embriões implantados e da prole, sugerindo que a PGE₂ afeta a ovulação e desempenha um papel importante na fertilidade feminina (HIZAKI et al., 1999; KENNEDY et al., 1999). Além disso, receptores funcionais para a PGE₂ (EP2 e EP4) na vesícula germinativa de oócitos de camundongos e macacos mostraram que a PGE₂ atua diretamente nos gametas femininos de mamíferos (DUFFY et al., 2010). Estudos anteriores, realizados em ratas já

havia demonstrado a capacidade da PGE_2 de reverter o efeito bloqueador de ovulação da indometacina, potente inibidor da síntese de prostaglandinas (TSAFRIRI et al., 1972; TSAFRIRI et al., 1973).

Apesar dessas constatações, ainda não foram relatados estudos sobre o efeito da PGE_2 na ovulação de camundongas pré-púberes. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da prostaglandina E_2 injetável na indução da ovulação de camundongas pré-púberes, tendo como hipótese que a injeção de prostaglandinas E_2 induz a ovulação em camundongas pré-púberes.

Materiais e Métodos

O estudo foi realizado entre fevereiro e novembro de 2016. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz Rondônia (Protocolo # 2014/12).

Estudo 1

Este experimento foi realizado na sala de experimentação do biotério da Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia (Fiocruz Rondônia), situado no município de Porto Velho, RO, Brasil (8°47'01.52" S; 63°51'32.95" O). Para este estudo, foram utilizadas 96 camundongas (linhagem BALB/c), pré-púberes, entre 18 e 22 dias de idade e pesando 20-25g. As fêmeas foram isoladas em gaiolas em sala climatizada a 24°C com iluminação artificial das 05:00 às 19:00 horas e com livre acesso a comida e água.

O desenho experimental está ilustrado na Figura 1A. As camundongas foram tratadas com uma dose intraperitoneal (i.p.) de 0,2 UI/g de peso-vivo (p.v.) de eCG (Gonadotrofina coriônica equina; Novormon[®], Zoetis-Pfizer, Cotia, Brasil; dose total = 5 UI por animal), no Dia 0 (arbitrário ao início do experimento) para superestimulação dos ovários. No Dia 2, as camundongas foram divididas aleatoriamente em 3 grupos experimentais para receberem: 1) 20 μ L/g de p.v. de PBS (Tampão fosfato-salino modificado por dulbecco; Biodux[®], Campinas, Brasil; dose total = 0.5 mL por animal; n=31), 2) 0,2 μ g/g de p.v. de GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina; Gonaxal[®], Biogénesis-Bagó, Curitiba, Brasil; dose total = 5 μ g por animal; n=32), e 3) 1 μ g/g de p.v. de PGE_2 (Prostaglandina E_2 ; Sigma-Aldrich, MO, USA; dose total = 25 μ g por animal; n=33). No Dia 3, cerca de 15h após a aplicação dos indutores de ovulação, as camundongas foram mortas através de deslocamento

da coluna cervical. Os ovidutos foram coletados e visualizados sob lupa estereomicroscópica para detecção dos complexos cumulus-oócito (CCO) no lúmen do oviduto, pela técnica de transiluminação, de acordo com o método adaptado de Bogle et al (2011). Com agulha hipodérmica 22G foi realizada a ruptura do oviduto para efetuar a retirada e contagem dos CCOs. A ovulação foi determinada pela presença dos CCOs na ampola do oviduto.

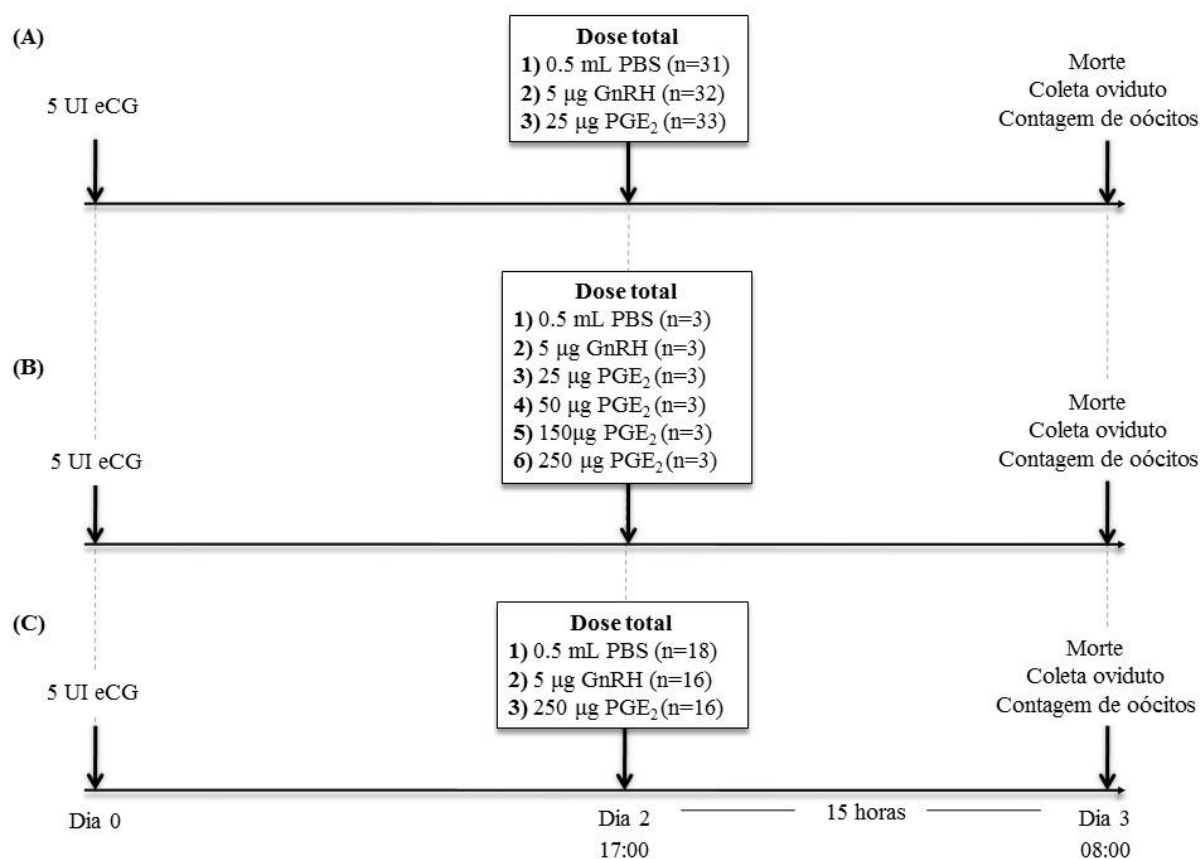
Estudo 2 – Estudo dose-resposta

Este estudo foi realizado para avaliar a dose-resposta da concentração de PGE₂ capaz de induzir ovulação em camundongas pré-púberes. Para este estudo foram utilizadas 18 camundongas pré-púberes da linhagem BALB/c que foram tratadas de forma similar ao Estudo 1 (Figura 1B), exceto que no Dia 2, as camundongas foram divididas aleatoriamente em 6 grupos experimentais para receberem via i.p.: 1) 20 µL/g de p.v. de PBS (Tampão fosfato-salino modificado por dulbecco; Biodux[®], Campinas, Brasil; dose total = 0.5 mL por animal; n=3), 2) 0,2 µg/g de p.v. de GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina; Gonaxal[®], Biogénesis-Bagó, Curitiba, Brasil; dose total = 5 µg por animal; n=3), 3) 1 µg/g de p.v. de PGE₂ (Prostaglandina E₂; Sigma-Aldrich, MO, USA; dose total = 25 µg por animal; n=3), 4) 2 µg/g de p.v. de PGE₂ (Prostaglandina E₂; Sigma-Aldrich, MO, USA; dose total = 50 µg por animal; n=3), 5) 6 µg/g de p.v. de PGE₂ (Prostaglandina E₂; Sigma-Aldrich, MO, USA; dose total = 150 µg por animal; n=3), e 6) 10 µg/g de p.v. de PGE₂ (Prostaglandina E₂; Sigma-Aldrich, MO, USA; dose total = 250 µg por animal; n=3).

Estudo 3

Este estudo foi realizado com o objetivo de comparar a melhor dose-resposta de PGE₂, obtida no estudo 2, com o GnRH. Neste estudo, foram utilizadas 50 camundongas pré-púberes da linhagem BALB/c, que foram tratadas de forma similar ao Estudo 1, entretanto, no Dia 2 foram separadas aleatoriamente para receberem via i.p.: 1) 20 µL/g de p.v. de PBS (Tampão fosfato-salino modificado por dulbecco; Biodux[®], Campinas, Brasil; dose total = 0.5 mL por animal; n=18), 2) 0,2 µg/g de p.v. de GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina; Gonaxal[®], Biogénesis-Bagó, Curitiba, Brasil; dose total = 5 µg por animal; n=16) e 3) 10 µg/g de PGE₂ (Prostaglandina E₂; Sigma-Aldrich, MO, USA; dose total = 250 µg por animal; n=16). O desenho experimental está ilustrado na Figura 1C.

Figura 1. Tratamentos hormonais utilizados para indução da ovulação em camundongas pré-púberes no Estudo 1 (A), Estudo 2 (B) e no Estudo 3 (C).



Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico SAS (1998). A média de oócitos coletados por camundongas foi analisada por análise de variância e as médias foram comparadas entre os grupos por meio do teste de Tukey. A proporção de camundongas que ovularam foi analisada pelo teste do Qui-quadrado ou Fischer, quando apropriado. Para obtenção da proporção de camundongas que ovularam, o número de camundongas que ovularam foi dividido pelo número de camundongas tratadas. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P \leq 0.05$ e foram considerados tendência quando o valor de P foi < 0.1 .

Resultados

No Estudo 1, a proporção de camundongas ovuladas e a média de oócitos coletados podem ser observadas na Tabela 1. A proporção de camundongas que ovularam foi maior após o tratamento com GnRH quando comparado com àquelas tratadas com PBS e PGE_2 ($P=0.001$). Não houve diferença na proporção de fêmeas que ovularam entre os grupos PBS e PGE_2 ($P>0.05$). A média de oócitos detectados foi maior no grupo GnRH do que nos demais grupos ($P=0.001$).

No Estudo 2, a proporção de camundongas ovuladas e a média de oócitos por camundongo, de acordo com o grupo, podem ser observadas na Tabela 2. Não houve diferença na proporção de fêmeas ovuladas entre os Grupos GnRH e 250 μg PGE_2 ($P=0.2$). Quando comparado aos demais grupos experimentais, fêmeas tratadas com GnRH tenderam a ter ($P<0.1$) e as tratadas com 250 μg de PGE_2 tiveram ($P<0.05$) mais ovulações. Nenhuma camundongo fêmea tratada com PBS, 25, 50 e 150 de μg de PGE_2 ovulou. A média de oócitos detectados tendeu a ser maior no grupo GnRH em relação aos demais grupos ($P=0.08$).

No estudo 3, a proporção de camundongas ovuladas e a média de oócitos por camundonga podem ser observadas na Tabela 3. A proporção de camundongas que ovularam e o número de oócitos ovulados foi maior nas fêmeas tratadas com GnRH e PGE_2 quando comparado com aquelas que receberam o tratamento com PBS ($P=0.001$).

Tabela 1. Proporção de camundongas pré-púberes que ovularam e média de oócitos por camundonga tratadas com PBS, GnRH e 25 µg de PGE₂.

Resposta ovariana	PBS	GnRH	25 µg de PGE ₂	Valor de P
Proporção de fêmeas ovuladas, n	9.7% (3/31) ^A	93.7% (30/32) ^B	3% (1/33) ^A	<0.001
Média de oócitos por camundonga	0.1 ± 0.1 ^A	10.2 ± 1.4 ^B	0.1 ± 0.1 ^A	<0.001

Abreviaturas: PBS, tampão fosfato-salino; GnRH, hormônio liberador de gonadotrofina; PGE₂, prostaglandina E₂.

^{AB}Valores com letras diferentes indicam diferença entre os grupos.

Tabela 2. Proporção de camundongas pré-púberes que ovularam e média de oócitos por camundonga tratadas com PBS, GnRH e diferentes doses de PGE₂.

Resposta ovariana	PBS	GnRH	25 µg PGE ₂	50 µg PGE ₂	150 µg PGE ₂	250 µg PGE ₂	Valor de P
Proporção de fêmeas ovuladas, n	0%, 0/3 ^{aA}	66.6%, 2/3 ^b	0%, 0/3 ^{aA}	0%, 0/3 ^{aA}	0%, 0/3 ^{aA}	100%, 3/3 ^B	< 0.01
Média de oócitos por camundonga	0.0 ± 0.0 ^a	5.6 ± 3.1 ^b	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	2.6 ± 0.3 ^{ab}	< 0.04

Abreviaturas: PBS, tampão fosfato-salino; GnRH, hormônio liberador de gonadotrofina; PGE₂, prostaglandina E₂; µg, micrograma.

^{ab}Valores com letras diferentes na mesma linha tendem a ser diferentes entre os grupos (P<0.1).

^{AB}Valores com letras diferentes na mesma linha diferem entre os grupos (P<0.05)

Tabela 3. Proporção de camundongas pré-púberes que ovularam e média de oócitos por camundonga tratadas com PBS, GnRH e 250 µg de PGE₂.

Resposta ovariana	PBS	GnRH	250 µg de PGE ₂	Valor de P
Proporção de fêmeas ovuladas, n	0% (0/18) ^A	93.7% (15/16) ^B	93.7% (15/16) ^B	<0.001
Média de oócitos por camundonga	0.0 ± 0.0 ^A	8.9 ± 1.3 ^B	6.4 ± 0.8 ^B	<0.001

Abreviaturas: PBS, tampão fosfato-salino; GnRH, hormônio liberador de gonadotrofina; PGE₂, prostaglandina E₂.

^{AB}Valores com letras diferentes indicam diferença entre os grupos.

Discussão

Os resultados deste experimento apoiaram a hipótese que o tratamento com PGE_2 induz ovulação em camundongas pré-púberes. Além disso, este é o primeiro estudo em que se avaliou a capacidade da prostaglandina E_2 em induzir ovulação em camundongas pré-púberes.

No Estudo 1, as camundongas que receberam 25 μg de PGE_2 para induzir a ovulação, assim como as que não receberam nenhum estímulo ovulatório (grupo PBS) não apresentaram oócitos no oviduto, diferentemente dos Estudos 2 e 3, onde os animais que receberam 250 μg de PGE_2 exibiram oócitos no oviduto igualmente ao grupo que recebeu o estímulo ovulatório com GnRH.

O Estudo 2 foi realizado para definir, qual seria a dose necessária de PGE_2 capaz de induzir a ovulação em camundongas pré-púberes, logo que a dose utilizada no Estudo 1 não exerceu efeito ovulatório nestes animais. Assim, com a resposta positiva obtida no Estudo 2 (administração de 250 μg de PGE_2), o Estudo 3 foi realizado para confirmar o efeito indutor de ovulação da PGE_2 por meio desta mesma dose.

A ovulação resultante da administração de 250 μg de PGE_2 (Estudo 2) está em conformidade com os resultados obtidos por Evans et al. (1983), onde foi constatado que quantidades relativamente altas de prostaglandinas podem desempenhar um importante papel na ovulação, além de contribuir na luteinização das células da granulosa. Neste mesmo estudo, porcas pré-púberes tratadas com eCG tiveram uma maior produção de prostaglandinas pelas células da teca e granulosa (EVANS et al., 1983). Além disso, a aplicação de indometacina em fêmeas imaturas de ratos, com pré-tratamento de eCG, bloqueou a ovulação e inibiu a secreção de LH, sugerindo que as PGs possam atuar em nível hipotálamo-hipófise (ARMSTRONG; GRINWICH, 1972; ORCZYK; BEHRMAN, 1972). A ovulação resultante da administração de 250 μg de PGE_2 também foi descrita em outros trabalhos, no entanto, também conseguiram induzir a ovulação através das injeções de 25 μg , 100 μg , 250 μg e 750 μg de PGE_2 em ratas em atividade estral, que haviam sido tratadas com indometacina (TSAFRIFI et al., 1973), diferindo deste estudo, onde a administração de 25 μg de PGE_2 não conseguiu induzir a ovulação em camundongas pré-púberes. A secreção de prostaglandinas pelo folículo pré-ovulatório está relacionado com o processo ovulatório (MURDOCH et al., 1993) e a PGE_2 sintetizada nas células da granulosa e teca (EVANS et al., 1983) tem ação direta sobre o folículo pré-ovulatório. Aparentemente, em camundongos, a PGE_2 liberada por astrócitos no hipotálamo estimula a secreção de GnRH, mostrando exercer um efeito

excitatório sobre os neurônios de GnRH, e sugerindo que a PGE₂ possui atuação como um gliotransmissor dentro do sistema neurosecretório de GnRH mediada por ativação de receptores EP2 (CLASADONTE, et al., 2011). O glutamato é o principal neurotransmissor na ativação dos neurônios de GnRH e possui capacidade de induzir a liberação de PGE₂ a partir de astrócitos por ativação dos receptores ErbB de astrócitos hipotalâmicos (ErbB1 e ErbB4), tendo a participação destes receptores na liberação de GnRH, início da puberdade e na função reprodutiva adulta (PREVOT, et al., 2003; PREVOT et al., 2005; CLASADONTE, et al., 2011). Naor et al. (2007) mostraram, em ratos, que a PGE₂ induziu a expressão de receptores para GnRH, o que não foi constatado com a PGF₂ α e PGI₂, e que a PGE₂ levou à secreção de LH através do GnRH. Adicionalmente, a administração de PGE₂ no terceiro ventrículo de ratas maduras aumentou a concentração e amplitude de pulsos de LH no fluido cerebrospinal e no soro destes animais, possuindo efeito supressor quando administrada juntamente com PGF₂ α (MATSUWAKI et al., 2017).

A ciclooxigenase-2 (também conhecida como COX, prostaglandina endoperóxido sintase-2 ou prostaglandina G/H sintase-2) é a enzima marca-passo da cascata do ácido araquidônico para a síntese de prostaglandinas e está presente no ovário de mamíferos (VANE et al., 1998; DUFFY; STOUFFER, 2001). Camundongos *knockout* para a expressão da COX-2 apresentaram defeitos na ovulação e na expansão das células do cumulus, comprometendo a maturação dos oócitos e subsequente formação de estigmas (LIM et al., 1997; DAVIS et al., 1999). A ovulação também foi restaurada através do tratamento com PGE₂ simultaneamente com gonadotrofinas nestes animais, sugerindo a implicação da síntese de prostanoídes pela COX-2 para diferenciação folicular e maturação de oócitos (DAVIS et al., 1999). O mesmo ocorreu com camundongas que tiveram a ovulação bloqueada por ação da indometacina e o efeito foi revertido através da injeção de PGE₂ e PGF₂ α (SAKSENA et al., 1974). Davis et al. (1999) relataram que camundongas *knockout* para a COX-2, quando tratadas simultaneamente com eCG, hCG e PGF₂ α , apresentaram resultados pouco satisfatórios quando comparada com a PGE₂ para a indução da ovulação. Embora o período entre o início de uma nova onda de LH e ruptura folicular seja diferente em roedores (14 horas), vacas (28-30 horas) e cavalos (36-48 horas), a síntese de COX-2 nas células da granulosa e as altas concentrações de prostaglandinas acontece em cada uma destas espécies aproximadamente 10 horas antes da ruptura do folículo (DUFFY; STOUFFER, 2001). Ratos com mutação nula do receptor EP2 para PGE₂ geraram defeitos na expansão do cumulus, ovulação e fertilização nestes animais (HIZAKI et al., 1999; TILLEY, et al. 1999; KENNEDY et al., 1999). Estes achados confirmam a participação da PGE₂ na ovulação a nível local. Além disso, logo que a secreção

de PGE₂ está aumentada próximo a ovulação, a administração da dose farmacológica de PGE₂ pode então desempenhar um papel na aceleração da ovulação.

Apesar de observarmos o efeito da PGE₂ na ovulação de camundongas pré-púberes, ainda não foi possível estudar se a indução da ovulação via PGE₂ pode resultar em iniciação da atividade estral e em sucesso no estabelecimento e manutenção da gestação. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa encontra-se trabalhando em novos experimentos para responder de maneira satisfatória a estes desafios. Além disso, novos estudos estão em andamento na tentativa de responder se a PGE₂ pode ser utilizada como indutor de ovulação em diferentes espécies, como em animais de grande porte, especialmente àquelas de interesse zootécnico

Em suma, a dose de 250 µg de PGE₂ é capaz de antecipar a ovulação em camundongas pré-púberes. Esse foi o primeiro estudo que demonstra que a PGE₂ induz a ovulação de um mamífero pré-púberes, podendo indicar que espécies de interesse zootécnico podem responder da mesma forma. Entretanto, fica evidente a necessidade de realizarem-se mais estudos para elucidar o efeito e o mecanismo de ação da PGE₂ na ovulação nessas espécies.

Referências

ARMSTRONG, D. T.; GRINWICH, D. L. Blockade of spontaneous and LH induced ovulation in rats by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis. **Prostaglandins**, v. 1, n. 1, p. 21-28, jan. 1972.

BJERSING, L.; CAJANDER, S. Ovulation and the mechanism of follicle rupture. **Cell and Tissue Research**, v. 149, n.3, p.313-327, jun. 1974.

BOGLE, O.A.; RATTO, M. H; ADAMS, G.P. Evidence for the conservation of biological activity of ovulation-inducing factor in seminal plasma. **Reproduction**, v. 142, p. 277-283, 2011.

CLASADONTE, J.; POULAIN, P.; HANCHATE, N.K.; CORFAS, G.; OJEDA, S.R.; PREVOT, V. Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, n.38, p. 16104-16109, set. 2011.

DAVIS, B.J.; LENNARD, D.E.; LEE, C.A.; TIANO, H.F.; MORHAM. S.G.; WETSEL, W.C.; LANGENBACH, R. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1 beta. **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2685-2695, jun., 1999.

DUFFY, D.M.; STOUFFER, R.L. The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle. **Molecular Human Reproduction**, v.7, n. 8, p. 731-739, mai. 2001.

DUFFY, D.M.; MCGINNIS, L.K.; VANDEVOORT, C.A.; CHRISTENSON, L.K. Mammalian oocytes are targets for prostaglandin E2 (PGE2) action. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 131, nov. 2010.

ESPEY, L.L. Ovarian contractility and its relationship to ovulation: a review. **Biology Reproduction**, v.19, n.3, p.540-541, out. 1978.

EVANS, G.; DOBIAS, M.; KING, G.J.; ARMSTRONG, D.T. Production of prostaglandins by porcine preovulatory follicular tissues and their roles in intrafollicular function. **Biology of Reproduction**, v.28, n.2, p. 322-328, mar. 1983.

HIZAKI, H.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; HIROSE, M.; SAJI, T.; USHIKUBI, F.; MATSUOKA, T.; NODA, Y.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, n.18, p. 10501-10506, ago. 1999.

HUNTER, R. H. **Physiology of the Graafian Follicle and Ovulation**. New York: Cambridge University Press, 2003.

KENNEDY, C.R.J.; ZHANG, Y.; BRANDON, S.; GUAN, Y.; COFFEE, K.; FUNK, C.D.; MAGNUSON, M.A.; OATES, J.A.; BREYER, M.D.; BREYER, R.M. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. **Nature Medicine**, v.5, n.2, p. 217-220, fev. 1999.

LIM, H.; PARIAS, B.C.; DAS, S.K.; DINCHUCK, J.E.; LANGENBACH, R.; TRZASKOS, J.M.; DEY, S.K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v.91, n.2, p.197-208, out. 1997.

MATSUWAKI, T.; KOMATSUDA, M.; FUJISAWA, M. D.; DOKE, M.; YAMANOUCHI, K.; NISHIHARA, M. Molecular species of prostaglandins involved in modulating luteinizing hormone pulses of female rats under infectious stress conditions. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 29, n. 7, p. 1-8, jul. 2017.

MURDOCH, W.J., HANSEN, T.R; McPHERSON, L.A. A review - role of eicosanoids in vertebrate ovulation. **Prostaglandins**, v. 46, n.2, p. 85-115, ago. 1993.

NAOR, Z.; JABBOUR, H.N.; NAIDICH, M.; PAWSON, A.J.; MORGAN, K.; BATTERSBY, S.; MILLAR, M.R.; BROWN, P.; MILLAR, R.P. Reciprocal cross talk between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and prostaglandin receptors regulates GnRH receptor expression and differential gonadotropin secretion. **Molecular Endocrinology**, v.21, n.2, p. 524-537, fev. 2007.

ORCZYK, G. P.; BEHRMAN, H. R. Ovulation blockade by aspirin or indomethacin in vivo. Evidence for a role of prostaglandin in gonadotrophin secretion. **Prostaglandins**, v. 1, n. 3, p. 3-20, jan. 1972.

PREVOT, V.; LOMNICZI, A.; CORFAS, G.; OJEDA, S.R. erbB-1 and erbB-4 receptores act in concert to facilitate female sexual development and mature reproductive function. **Endocrinology**, v.146, n.3, p. 1465-1472, abr. 2005.

PREVOT, V.; RIO, C.; CHO, G.J.; LOMNICZI, A.; HEGER, S.; NEVILLE, C.M.; ROSENTHAL, N.A.; OJEDA, S.R.; CORFAS, G. Normal female sexual development requires neuregulin-erbB receptor signaling in hypothalamic astrocytes. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v.23, n.1, p. 230-239, jan. 2003.

SAKSENA, S. K., LAU, I. F. & SHAIKH, A. A. Cyclic changes in the uterine tissue content of F-prostaglandins and the role of prostaglandins in ovulation in mice. **Fertility and Sterility**, v.25, n.7, p. 636-642, jul. 1974.

TILLEY, S.L.; AUDOLY, L.P.; HICKS, E.H.; KIM, H.S.; FLANNERY, P.J.; COFFMANN, T.M.; KOLLER, B. H. Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin receptor. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 11, p. 1539–1545, jun., 1999.

TSAFRIRI, A.; LINDNER, H.R.; ZOR, U.; LAMPRECHT, S.A. Physiological role of prostaglandins in the induction of ovulation. **Prostaglandins**, v.2, n.1, p. 1-10, jul. 1972.

TSAFRIRI, A.; KOCH, Y.; LINDNER, H.R. Ovulation rate and serum LH levels in rats treated with indomethacin or prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v.3, n.4, p. 461-467, abr. 1973.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97-120, 1998.

WALLES, B.; OWMAN, C.; SCHMIDT, G.; SJÖBERG, N.O. Evidence for role of prostaglandins in the adrenergic neuromuscular mechanisms of the ovarian follicle wall. **Neuroendocrinology**, v.43, n.1, p.18-23, 1986.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 206-228, 2006.

WONG, W. Y.; RICHARDS, J. S. Evidence for two antigenically distinct molecular weight variants of prostaglandin H synthase in the rat ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 5, n. 9, p. 1269–1279, set. 1991.

YOSHIMURA, Y.; WALLACH, E.E. Studies of the mechanism(s) of mammalian ovulation. **Fertility and Sterility**, v.47, n.1, p. 22-34, jan. 1987.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados dos estudos apresentados, pode-se afirmar que a prostaglandina E_2 exógena induz a ovulação em camundongas pré-púberes. Além disso, a partir dos resultados obtidos em cobaias, o próximo passo será realizar novos experimentos para avaliarmos a resposta em animais de grande porte, bem como elucidar o mecanismo de ação da PGE_2 no sistema reprodutivo de mamíferos pré-púberes.

Futuramente, a utilização do PGE_2 como indutor de ovulação em protocolos poderá se tornar uma alternativa aos ésteres de estradiol após estudos mais aprofundados sobre a ação e atuação dessa molécula, além da resposta dos animais ao tratamento para indução a ovulação de maneira sincronizada (protocolos hormonais para controle do ciclo estral).

REFERÊNCIAS GERAIS

AGÊNCIA DE DEFESA SANITÁRIA AGROSILVOPASTORIL DO ESTADO DE RONDÔNIA-IDARON. Disponível em: <http://www.idaron.ro.gov.br/portal/nwVerNoticia.aspx?idNoticia=648>. Acesso em: 19 dez. 2016.

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - ANUALPEC. São Paulo: FNP Consultoria & Comercio, 2016.

ARMSTRONG, D. T.; GRINWICH, D. L. Blockade of spontaneous and LH-induced ovulation in rats by indomethacin, an inhibitor of prostaglandins biosynthesis. **Prostaglandins**, v.1, n.1, p. 21-28, jan., 1972.

AROSH, J.A.; BANU, S.K.; CHAPDELAINE, P.; MADORE, E.; SIROIS, J.; FORTIER, M.A. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. **Endocrinology**, v.145, n. 5, p.2551-2560, mai., 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES – ABIEC. **Exportações Brasileiras de Carne Bovina**. São Paulo, 2016. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/download/anual-310816.pdf>. Acesso em 19 dez. 2016.

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M.V.; DENNIS, E.A. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Letters**, v. 531, n.1, p. 2-6, out. 2002.

BARRETA, M.H. **O efeito da angiotensina II na maturação nuclear de oócitos bovinos é mediado pelas prostaglandinas E₂ e F₂α**. 2008. 61 f. Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Rurais, Universidade de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O. Programas da sincronização da ovulação em gado de corte. In: Simpósio de Reprodução Bovina, 2002, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre, Brasil, 2002. p. 32-35.

BEN-AMI, I.; FREIMANN, S.; ARMON, L.; DANTES, A.; STRASSBURGER, D.; FRIEDLER, S.; RAZIEL, A.; SEGER, R.; RON-EL, R.; AMSTERDAM, A. PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. **Molecular Human Reproduction**, v.12, n.10, p.593-599, ago., 2006.

BERGSTROM, S.; CARLSON, L.A.; WEEKS, J.R. The prostaglandins: a family of biologically active lipids. **Pharmacological Reviews**, v. 20, n.1, p. 1–48, mar. 1968.

BERGSTROM, S.; ELIASSON, R.; EULER, U.S.V.; SJOVALL, J. Some biological effects of two crystalline prostaglandin factors. **Acta Physiol Scand.**, v. 45, p. 133-144, abr. 1959.

BERGSTROM, S.; RYHAGE, R.; SAMUELSSON, B.; SJÖVALL, J. The structure of prostaglandin E, F₁ and F₂. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 16, p. 501-502, 1962.

BERGSTROM, S.; SJÖVALL, J. The isolation of prostaglandin. **Acta Chemica Scandibavica**, v. 11, p. 1086, 1957.

BJERSING, L.; CAJANDER, S. Ovulation and the mechanism of follicle rupture. **Cell and Tissue Research**, v. 149, n.3, p.313-327, jun. 1974.

BOGLE, O.A.; RATTO, M. H; ADAMS, G.P. Evidence for the conservation of biological activity of ovulation-inducing factor in seminal plasma. **Reproduction**, v. 142, p. 277-283, 2011.

BO, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, jan., 1995.

BO, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRÍBULO, H.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, 1994.

BRÄNNSTRÖM, M.; NORMAN, R.J.; SEAMARK, RF.; ROBERTSON, S.A. Rat ovary produces cytokines during ovulation. **Biology of Reproduction**, v.50, n. 1, p. 88-94, jan. 1994.

BRÄNNSTRÖM, M.; WANG, L.; NORMAN, R.J. Effects of cytokines on prostaglandin production and steroidogenesis of incubated preovulatory follicles of the rat. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 1, p. 165-171, jan. 1993.

BREYER, M.D.; JACOBSON, H.R.; BREYER, R.M. Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, n. 1, p. 8-17, jan. 1996.

BRIDGES, P. J.; FORTUNE, J. E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 263, n. 1-2, p. 1-9, jan., 2007.

CALDER, M. D.; CAVENEY, A.N.; WESTHUSIN, M.E.; WATSON, A.J. Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2(PGE2) Receptor Messenger RNAs Are Affected by Bovine Oocyte Maturation Time and Cumulus-Oocyte Complex Quality, and PGE2 Induces Moderate Expansion of the Bovine Cumulus In Vitro. **Biology of Reproduction**, v.65, n.1, p. 135-140, jul., 2001.

CASTRO, N.A. **Prostaglandina F2 α como indutor de ovulação em bovinos e bubalinos criados no Bioma Amazônia**. 2015. 62 f. Dissertação, Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

CHEPENIK, K. P.; DIAZ, A.; JIMENEZ, S. S. Epidermal Growth Factor Coordinately Regulates the Expression of Prostaglandin G/H Synthase and Cytosolic Phospholipase A₂ Genes in Embryonic Mouse Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 34, p. 21786-21792, ago. 1994.

CLASADONTE, J.; POULAIN, P.; HANCHATE, N.K.; CORFAS, G.; OJEDA, S.R.; PREVOT, V. Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing

hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, n.38, p. 16104-16109, set. 2011.

COMUNIDADE EUROPEIA. **Diretiva 96/23 /CE, de 29 de Abril de 1996 sobre medidas para monitorar determinadas substâncias e seus resíduos nos animais vivos e seus produtos, e que revoga as Diretivas 85/358 /CEE e 86/469 /CEE e as decisões 89/187 / CEE e 91/664/ CEEC**. Jornal Oficial da União Europeia, L:125/ 3, 1996.

COMUNIDADE EUROPEIA. **Diretiva 2008/97/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 19 de Novembro de 2008 que altera a Diretiva 96/22/CE do Conselho relativa à proibição de utilização de certas substâncias com efeitos hormonais ou tireostáticos e de substâncias β -agonistas em produção animal**. Jornal Oficial da União Europeia, L:318/9, 2008.

DAVIS, B.J.; LENNARD, D.E.; LEE, C.A.; TIANO, H.F.; MORHAM. S.G.; WETSEL, W.C.; LANGENBACH, R. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1 beta. **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2685–2695, jun., 1999.

DENNIS, E.A.; CAO J.; HSU, Y.H.; MAGRIOTI V.; KOKOTOS G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130-6185, set. 2011.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **The Journal Biology Chemistry**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, mai. 1994.

DENNIS, E.A. Introduction to Thematic Review Series: Phospholipases: Central Role in Lipid Signaling and Disease. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 3, p. 1245-1247, jul. 2015.

DENNIS, E. A. Phospholipases. In: **The Enzymes**. 3 ed. Nova York: Academic Press, 1983. Vol. 16, p. 307 – 353.

DEWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1083, n. 2, p. 121-134, mai. 1991.

DIAZ, A.; REGINATO, A.M.; JIMENEZ, S.A. Alternative splicing of human prostaglandin G/H synthase mRNA and evidence of differential regulation of the resulting transcripts by transforming growth factor beta 1, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 15, p. 10816-10822, mai. 1992.

DUFFY, D.M.; STOUFFER, R.L. The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 8, p. 731-739, mai. 2001.

DUFFY, D.M.; MCGINNIS, L.K.; VANDEVOORT, C.A.; CHRISTENSON, L.K. Mammalian oocytes are targets for prostaglandin E2 (PGE2) action. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 131, nov. 2010.

EMPRESA ESTADUAL DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL - EMATER. **Bovinocultura de corte**. Porto Velho, 2016. Disponível em: <http://www.emater.ro.gov.br/ematerro/bovinocultura-de-corte/>. Acesso em 19 dez. 2016.

EPPIG, J. J. Prostaglandin E2 stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. **Biology of Reproduction**, v. 25, n. 1, p. 191-195, ago., 1981.

ESPEY, L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 233-238, fev. 1994.

ESPEY, L.L. Ovarian contractility and its relationship to ovulation: a review. **Biology of Reproduction**, v.19, n.3, p.540-541, out. 1978.

EULER, U.S.V. Further investigations into prostaglandin, the physiologically active substance of certain genital glands. **Skandinavisches Archiv fur Physiologie**, v. 81, p. 65-80, 1939.

EULER, U.S.V. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). **The Journal of Physiology**, v. 88, n. 2, p. 213-234, nov. 1936.

EULER, U.S.V. Über die spezifische blutdruckeerkennende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekretes. **Klin. Wochensh.**, v. 14, p. 1182-1183, 1935.

EVANS, G.; DOBIAS, M.; KING, G.J.; ARMSTRONG, D.T. Production of prostaglandins by porcine preovulatory follicular tissues and their roles in intrafollicular function. **Biology of Reproduction**, v.28, n.2, p. 322-328, mar. 1983.

FERNANDES, A.C.F.; FIGUEIREDO, A.C.S. Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 406-414, jul./set. 2007.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2003.

HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 3, p. 144-150, mar. 2002.

HEDIN, L.; GADDY-KURTEN, D.; KURTEN, R.; DEWITT, D. L.; SMITH, W. L.; RICHARDS, J. S. Prostaglandin endoperoxide synthase in rat ovarian follicles: content, cellular distribution, and evidence for hormonal induction preceding ovulation. **Endocrinology**, v. 121, n. 2, p. 722-731, ago. 1987.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2 – 10 Years Later. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 2, p. 367-375, fev. 2002.

HIZAKI, H.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; HIROSE, M.; SAJI, T.; USHIKUBI, F.; MATSUOKA, T.; NODA, Y.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin

E receptor subtype EP2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n.18, p.10501–10506, ago., 1999.

HUNTER, R. H. **Physiology of the Graafian Follicle and Ovulation**. New York: Cambridge University Press, 2003.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; O'BRIEN, M.; EPPIG, J. J. Regulation of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 messenger ribonucleic acid in mouse granulosa cells during ovulation. **Endocrinology**, v. 142, n. 7, p. 3187-3197, jul. 2001.

KATZUNG, B.G.; MASTERS, S.B.; TREVOR, A.J. **Farmacologia básica e clínica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KENNEDY, C. R. J.; ZHANG, Y.; BRANDON, S.; GUAN, Y.; COFFEE, K.; FUNK, C.D.; MAGNUSON, M.A.; OATES, J.A.; BREYER, M. D.; BREYER, R. M. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. **Nature Medicine**, v. 5, n. 2, p. 217–220, fev. 1999.

KHAN, S.A.; SCHMIDT, K.; HALLIN, P.; DI PAULI, R.; DE GEYTER, C.; NIESCHLAG E. Human testis cytosol and ovarian follicular fluid contain high amounts of interleukin-1-like factor(s). **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 58, n. 2-3, p. 221-230, ago. 1988.

KNOBIL, E.; NEILL, J.M. **Physiology of Reproduction**. 3 ed. Saint Louis: Elsevier Inc., 2006.

KOTWICA J, BOGACKI M, REKAWIECKI R. Neural regulation of the bovine corpus luteum. **Domestic Animals Endocrinology**, v. 5341, n. 1-2, p.299-308, jul. 2002.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498-512, jul./ago. 2002.

KURZROK, R.; LIEB, C.C. Biochemical studies of human semen. II: The action of semen on the human uterus. **Experimental Biology and Medicine**, v. 28, n. 3, p. 268-272, dez. 1930.

LEONARDI, C.E.P.; PFEIFER, L.F.M.; RUBIN, M.I.B.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R.J.; PESSOA, G.A.; BAINYA, A.M.; SILVA, C.A.M. Prostaglandin F2 α promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, p. 1578–1582, out. 2012.

LI, Q.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; KONABAYASHI, Y.; IRELAND, J.J.; SMITH, G.W. Effect of intrafollicular indomethacin injection on gonadotropin surge induced expression of select extracellular matrix degrading enzymes and their inhibitors in bovine preovulatory follicles. **Reproduction**, v.131, n.3, p.533-543, mar., 2006.

LIM, H.; PARIA; B.C.; DAS, S.K.; DINCHUCK, J.E.; LANGENBACH, R.; TRZASKOS, J.M.; DEY, S.K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v.91, n.2, p.197-208, out. 1997.

LIU, J.; CARRIÉRE, P.D.; DORÉ, M.; SIROIS, J.. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1524-1531, dez. 1997.

LYONS-GIORDANO, B.; PRATA, M.A.; GALBRAITH, W.; DAVIS, G.L.; ARNER, E.C. Interleukin-1 Differentially Modulates Chondrocyte Expression of Cyclooxygenase-2 and Phospholipase A2. **Experimental Cell Research**, v.206, n.1, p.58-62, mai. 1993.

MARQUES, C.C.; PEREIRA, R.M.; VASQUES, M.I.; BAPTISTA, M.C.; HORTA, A.E.M. Role of prostaglandins on bovine oocyte maturation in vitro. In: **Iberian Congress On Animal Reproduction**. Estoril: Portuguese Animal Reproduction Society, 1997. p.142-149.

MATSUWAKI, T.; KOMATSUDA, M.; FUJISAWA, M. D.; DOKE, M.; YAMANOUCHI, K.; NISHIHARA, M. Molecular species of prostaglandins involved in modulating luteinising hormone pulses of female rats under infectious stress conditions. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 29, n. 7, p. 1-8, jul. 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Bovinos e Bubalinos**. Brasília, 2016. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/09/rebanho-bovino-alcanca-215-2-milhoes-de-cabecas-em-2015>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Plano Mais Pecuária**. Brasília: MAPA/ACS, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Valor Bruto da produção agropecuária bate recorde em 2015**. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/01/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-bate-recorde-em-2015>. Acesso em: 19 dez. 2016.

MOREIRA, V. **Efeitos de toxinas com estrutura de fosfolipase A₂ isoladas do veneno de *Bothrops asper* e *Crotalus durissus terrificus*, e dos respectivos venenos, sobre a expressão de ciclooxygenases e produção de prostaglandinas**. 2007. 132 f. Tese, Doutorado em Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; ATSUMI, G.; INOUE, I. Regulatory functions of phospholipase A2. **Critical Review in Immunology**, v.17,n. 3-4, p. 225-283, 1997.

MURDOCH, W.J. Differential effects of indomethacin on the sheep ovary: Prostaglandin biosynthesis, intracellular calcium, apoptosis, and ovulation. **Prostaglandins**, v. 52, n. 6, p. 497-506, dez., 1996.

MURDOCH, W. J. Disruption of cellular associations within the granulosa compartment of periovulatory ovine follicles: Relationship to maturation of the oocyte and regulation by prostaglandins. **Cell and tissue research**, v.252, n.2, p.459-462, mai., 1988.

MURDOCH, W. J.; DAILEY, R. A.; INSKEEP, E. K. Preovulatory changes in prostaglandins E2 and F2a in ovine follicles. **Journal of Animal Science**, v. 53, p.192-205, 1981.

MURDOCH, W.J.; HANSEN, T.R.; McPHERSON, L.A. A review - role of eicosanoids in vertebrate ovulation. **Prostaglandins**, v. 46, n.2, p. 85-115, ago. 1993.

MURDOCH, W. J.; MCCORMICK, R. J. Dose-dependent effects of indomethacin on ovulation in sheep: relationship to follicular prostaglandin production, steroidogenesis, collagenolysis and leukocyte chemotaxis. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 6, p. 907-911, dez., 1991.

MURDOCH, W.J.; PETERSON, T.A.; VAN KIRK, E.A.; VINCENT, D.L.; INSKEEP, E.K. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. **Biology of Reproduction**, v.35, n. 5, p. 1187-1194, dez., 1986.

NAOR, Z.; JABBOUR, H.N.; NAIDICH, M.; PAWSON, A.J.; MORGAN, K.; BATTERSBY, S.; MILLAR, M.R.; BROWN, P.; MILLAR, R.P. Reciprocal cross talk between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and prostaglandin receptors regulates GnRH receptor expression and differential gonadotropin secretion. **Molecular Endocrinology**, v.21, n.2, p. 524 -537, fev. 2007.

NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.414-421, 2010.

O'GRADY, J. P.; CALDWELL, B. V.; AULETTA, F. J.; SPEROFF, L. The effects of an inhibitors of prostaglandin synthesis (indomethacin) on ovulation, pregnancy, and pseudopregnancy in the rabbits. **Prostaglandins**, v.1, n. 2, p. 97-106, fev., 1972.

ONOE, Y; MIYAURA, C.; KAMINAKAYASHIKI, T.; NAGAI, Y.; NOGUCHI, K.; CHEN, Q.R.; SEO, H.; OHTA, H.; NOZAWA, S.; KUDO, I.; SUDA, T. IL-13 and il-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblast. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 2, p. 758-764, jan. 1996.

ORCZYK, G. P.; BEHRMAN, H. R. Ovulation blockade by aspirin or indomethacin in vivo. Evidence for a role of prostaglandin in gonadotrophin secretion. **Prostaglandins**, v. 1, n. 3, p. 3-20, jan. 1972.

PARK, J.Y.; SU, Y.Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v.303, n.5658, p.682-684, jan., 2004.

PAULA, N.R.; CARDOSO, J.F.S.; OLIVEIRA, M.A.L.; FREITAS, V.J.F. Embriões caprinos produzidos *in vitro* ou *in vivo*: técnicas, problemas e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 21-35, jan./mar. 2008.

PFEIFER, L.F.M.. CORRÊA, M.N.; SCHIMMIT, E.; VIEIRA, M.B.; MADRUGA, E, Á.; RABASSA, V.R. Uso de PGF2 α associado ao benzoato de estradiol para Inseminação artificial em tempo-fixado em vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Agropecuária**, v. 11, n. 3, p. 347-350, jul-set. 2005.

PFEIFER, L.F.M; FERREIRA, R. **Ginecologia e ultrassonografia reprodutiva em bovinos**. Brasília: Embrapa, 2015.

PFEIFER, L. F. M.; LEONARDI, C. E. P.; CASTRO, N. A.; VIANA, J. H. M., SIQUEIRA, L. G. B.; CASTILHO, E. M.; SINGH, J.; KRUSSE, R. H., RUBIN, M. I. B. The use of PGF 2 α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p. 689-695, mar. 2014.

PFEIFER, L.F.M.; SIQUEIRA, L.G.; MAPLETOFT, R.J.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; COLAZO, M.G. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 72, p. 1054–64, nov. 2009.

PHILLIPS, D. M.; DEKEL, N. Effect of gonadotropins and prostaglandin on cumulus mucification in cultures of intact follicles. **Journal of Experimental Zoology**, v. 221, n. 3, p. 275–282, jul., 1982.

PREVOT, V.; LOMNICZI, A.; CORFAS, G.; OJEDA, S.R. erbB-1 and erbB-4 receptores act in concert to facilitate female sexual development and mature reproductive function. **Endocrinology**, v.146, n.3, p. 1465-1472, abr. 2005.

PREVOT, V.; RIO, C.; CHO, G.J.; LOMNICZI, A.; HEGER, S.; NEVILLE, C.M.; ROSENTHAL, N.A.; OJEDA, S.R.; CORFAS, G. Normal female sexual development requires neuregulin-erbB receptor signaling in hypothalamic astrocytes. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v.23, n.1, p. 230-239, jan. 2003.

RAMWELL, P.W.; LEOVEY, E.M.K.; SINTETOS, A.L. Regulation of the Arachidonic Acid Cascade. **Biology of Reproduction**, v. 16, n.1, p. 70-87, fev. 1977.

RANDEL, R. D.; LAMMOGLIA, M. A.; LEWIS, A. W.; NEUENDORFF, D.A.; GUTHRIE, M. J. Exogenous PGF_{2a} enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. **Theriogenology**, v. 45, n. 3, p. 643–654, fev., 1996.

RICHARDS, J.S. Sounding the alarm--does induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 control the mammalian ovulatory clock?. **Endocrinology**, v. 138, n.10, p.4047-4048, out. 1997.

SAKSENA, S. K., LAU, I. F. & SHAIKH, A. A. Cyclic changes in the uterine tissue content of F-prostaglandins and the role of prostaglandins in ovulation in mice. **Fertility and Sterility**, v.25, n.7, p. 636-642, jul. 1974.

SIROIS, J. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. **Endocrinology**, v. 135, n. 3, p. 841-848, set. 1994.

SIROIS, J.; DORE, M. The late induction of prostaglandin G/H Synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4427-4434, out. 1997.

SIROIS, J.; SIMMONS, D.L.; RICHARDS, J.S. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro. **Journal of Biological**

Chemistry, v. 267, n. 16, p. 11586-11592, jun. 1992.

SMITH, W.L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **The American journal of physiology**, v. 263, n.2, p. 181-191, ago. 1992.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

SUGIMOTO, Y.; YAMASAKI, A.; SEGI, E.; TSUBOI, K.; AZE, Y.; NISHIMURA, T.; OIDA, H.; YOSHIDA, N.; TANAKA, T.; KATSUYAMA, M.; HASUMOTO, K.; MURATA, T.; HIRATA, M.; USHIKUBI, F.; NEGISHI, M.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. **Science**, v. 277, n. 5326, p. 681–683, ago., 1997.

TAKAHASHI, T.; MORROW, J.D.; WANG, H.; DEY, S.K. Cyclooxygenase-e-derived Prostaglandin E2 Directs Oocytes Maturation by Differentially Influencing Multiple Signaling Pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 48, p.37117-37129, dez. 2004.

TILLEY, S.L.; AUDOLY, L.P.; HICKS, E.H.; KIM, H.S.; FLANNERY, P.J.; COFFMANN, T.M.; KOLLER, B. H. Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin receptor. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 11, p. 1539–1545, jun., 1999.

TSAFRIRI, A.; LINDNER, H.R.; ZOR, U.; LAMPRECHT, S.A. Physiological role of prostaglandins in the induction of ovulation. **Prostaglandins**, v.2, n.1, p. 1-10, jul. 1972.

TSAFRIRI, A.; KOCH, Y.; LINDNER, H.R. Ovulation rate and serum LH levels in rats treated with indomethacin or prostaglandin E2. **Prostaglandins** , v.3, n.4, p. 461-467, abr. 1973.

TSAL, S.; WILTBANK, M.C. Prostaglandin F2 α induces expression of prostaglandin G/H Synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of Reproduction**, v.57, n. 5, p.1016-1022, 1997.

TSAL, S.; WILTBANK, M.C.; BODENSTEINER, K.J. Distinct mechanisms regulate induction of messenger ribonucleic acid for prostaglandin (PG) G/H synthase-2, PGE (EP3) receptor, and PGF2 α receptor in bovine preovulatory follicles. **Endocrinology**, v. 137, n.8, p.3348–3355, ago., 1996.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97-120, 1998.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SA, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 257-262, jun. 1999.

WALLES, B.; OWMAN, C.; SCHMIDT, G.; SJÖBERG, N.O. Evidence for role of prostaglandins in the adrenergic neuromuscular mechanisms of the ovarian follicle wall. **Neuroendocrinology**, v.43, n.1, p.18-23, 1986.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 206-228, jan. 2006.

WONG, W. Y.; RICHARDS, J. S. Evidence for two antigenically distinct molecular weight variants of prostaglandin H synthase in the rat ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 5, n. 9, p. 1269–1279, set. 1991.

YOSHIMURA, Y.; WALLACH, E.E. Studies of the mechanism(s) of mammalian ovulation. **Fertility and Sterility**, v.47, n.1, p. 22-34, jan. 1987.

XIE, W.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L.; ERIKSON, R.L.; SIMMONS, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 88, n. 7, p. 2692-2696, abr. 1991.